

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 4 avril 2017

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à une demande d'avis relatif à l'exposition alimentaire aux nanoparticules de dioxyde de titane.

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 31 janvier 2017 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, la Direction Générale de la Santé et la Direction Générale de l'alimentation pour rendre un avis sur l'exposition alimentaire aux nanoparticules de dioxyde de titane. Cette saisine fait suite à la publication de Bettini *et al.* (2017).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le E171 est un additif alimentaire utilisé en tant que colorant. Il se présente sous la forme d'un mélange de particules de TiO₂ à l'état dispersé, agrégé ou aggloméré dont la taille varie de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres. Les données de la littérature indiquent que la proportion de particules considérées comme nanoparticules (*i.e.* dont les trois dimensions sont inférieures ou égales à 100 nm) au sein de l'additif alimentaire E171 peut varier de 0 à 39% en nombre et de 0 à 3,2% en masse (EFSA 2016). Ainsi, d'après la recommandation de définition proposée par la Commission européenne¹, le E171 n'est pas considéré comme un nanomatériau car le nombre de particules ayant une ou plusieurs dimensions externes dans la gamme comprise entre 1-100 nm représente moins de 50% de la population totale des particules.

En 2006, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé le dioxyde de titane dans le groupe des substances « cancérogènes possibles chez l'Homme (2B) » par voie pulmonaire. A ce jour, le TiO₂ ne fait pas l'objet d'un classement harmonisé européen, au titre du règlement (CE) n°1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, dit règlement « CLP ».

¹ D'après la recommandation de définition de la Commission européenne datée du 18 octobre 2011, les nanomatériaux sont définis comme des matériaux naturels, accidentels ou manufacturés contenant des particules à l'état libre, agrégé ou aggloméré et dont plus de 50 % du nombre de particules présentent une ou plusieurs dimensions comprises entre 1 et 100 nm.

L'apparition de tumeurs pulmonaires chez le rat après inhalation ou instillation de TiO₂ a amené l'Anses, le 20 mai 2015, à soumettre à l'ECHA une proposition de classement du dioxyde de titane en tant que substance cancérigène de catégorie 1B (substance dont le potentiel cancérigène pour l'être humain est supposé) par voie pulmonaire, dans le cadre du règlement CLP. Cette proposition tend à couvrir le TiO₂ sous toutes ses phases cristallines et combinaisons de phases, tailles inférieures à 10 µm et morphologies de particules. Une décision de l'ECHA est attendue pour le second semestre 2017.

En 2016, l'autorité européenne de sécurité des aliments (Efsa) a publié un avis relatif à la réévaluation du E171 (EFSA, 2016) sur la base d'une revue détaillée des données de la littérature relatives aux particules de TiO₂ (partie 3.2). Cet avis conclut que les expositions actuelles des consommateurs au E171 dans ses utilisations alimentaires ne sont pas de nature à entraîner un risque sanitaire.

En 2017, une étude a été menée chez le rat afin d'étudier le passage et la distribution de TiO₂ dans quelques organes cibles après administration orale, les effets génotoxiques et inflammatoires du TiO₂ au niveau intestinal ainsi que les effets d'initiation et de promotion de lésions prénéoplasiques au niveau du côlon (Bettini *et al.*, 2017).

Au regard de la publication de Bettini *et al.*, il est demandé à l'Anses :

1. De réaliser une étude critique détaillée de cette publication et de déterminer si cette seule étude est de nature à remettre en cause les conclusions de l'Efsa relatives à la réévaluation du E171 publiée en septembre 2016.
2. Si nécessaire, de proposer des recommandations sur les voies de travail prioritaires concernant la caractérisation et la toxicité du E171.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du groupe d'expertise collective en urgence (GECU) « TiO₂ » réuni le 24 février et le 24 mars 2017, sur la base de rapports d'expertise préparés par les experts du GECU. Ces travaux ont été adoptés par le GECU le 24 mars 2017. Les travaux du GECU ont été présentés au comité d'experts spécialisé « évaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA) et au groupe de travail « évaluation des substances et procédés soumis à autorisation en alimentation humaine » (GT ESPA).

Le GECU a auditionné les auteurs de la publication de Bettini *et al.* en présence de représentants de l'Efsa et de deux de ses experts et d'un agent de l'ANSM le 9 mars 2017.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts ou les coordonnateurs de l'expertise avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

On rappellera que l'étude dont la saisine est l'objet a été en partie financée par l'Anses dans le cadre de son appel à projets de recherche « environnement santé travail » (PNR-EST, projet NanoGut).

3. ANALYSES ET CONCLUSIONS DU GT ESPA

3.1. L'additif alimentaire E171

L'additif alimentaire E171 est constitué de particules de dioxyde de titane (TiO₂, numéro CAS: 13463-67-7). Le TiO₂ est une substance inorganique présente sous deux formes cristallines majoritaires (anatase et rutile) et dont la masse moléculaire est de 79,88 g/mol. Le E171 se présente sous la forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau et les solvants organiques mais soluble dans l'acide fluorhydrique et l'acide sulfurique concentré à chaud. Les données de la littérature indiquent une grande variabilité concernant la proportion des phases cristallines et la distribution en taille des différents lots de E171 présents dans le commerce (Yang *et al.* 2014 ; EFSA 2016). La taille des particules peut varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres sous une forme dispersée, agrégée ou agglomérée. Le pourcentage de particules considérées comme nanoparticulaires (*i.e.* dont les 3 dimensions sont inférieures ou égales à 100 nm) varie de 0 à 39% en nombre et de 0 à 3,2% en masse (EFSA 2016).

L'additif alimentaire E171 est majoritairement utilisé en tant que colorant alimentaire, les niveaux maximaux d'incorporation ont été définis au sein du règlement (CE) n°1333/2008 relatif aux additifs alimentaires. Ainsi, pour les 51 catégories d'aliments répertoriés dans l'annexe II de ce règlement, le E171 peut être utilisé *quantum satis*².

3.2. Résumé de l'avis de l'Efsa relatif à la réévaluation du E171

En 2016, l'autorité européenne de sécurité des aliments a publié un avis relatif à la réévaluation du E171 (EFSA, 2016) sur la base d'une revue détaillée des données de la littérature relatives aux particules de TiO₂. Concernant les données disponibles sur l'absorption, la distribution et l'excrétion, le groupe d'experts de l'Efsa a conclu que l'absorption du TiO₂ est extrêmement faible suite à son administration par voie orale et qu'une faible quantité de TiO₂ (au maximum 0,1% de la dose administrée) est absorbée au niveau du tissu lymphoïde intestinal. Suite à son absorption, le TiO₂ est distribué dans différents organes présentant chacun des taux d'accumulation et d'élimination variables. Cependant, la grande majorité du TiO₂ est éliminée dans les fèces.

De nombreuses études de génotoxicité *in vivo* et *in vitro* basées sur des tests d'aberration chromosomique, sur le potentiel mutagène, sur les dommages à l'ADN y compris les oxydations de bases, etc. ont été rapportées pour différentes tailles et cristallinités de particules de TiO₂ et donnent des résultats contradictoires. Néanmoins, le panel d'experts de l'Efsa rappelle que la fiabilité du test relatif aux dommages à l'ADN (test des comètes) a été remise en question lors de son application avec des nanomatériaux. En effet, des études soulignent le fait que les dommages à l'ADN sont causés par les nanoparticules de TiO₂ durant les étapes post traitement et non pas durant le traitement lui-même. Le panel remet également en cause la fiabilité de certains résultats positifs observés pour des études *in vivo* et *in vitro* dans lesquelles la variation des paramètres expérimentaux peut affecter la stabilité des particules modifiant ainsi leur biodisponibilité et leur activité biologique.

L'avis de l'Efsa (2016) conclut « en se basant sur les données d'absorption, de distribution et d'excrétion ainsi que sur les données de génotoxicité, que les particules (nano et micrométriques) de TiO₂ ingérées par voie orale ne présentent pas de préoccupation génotoxique *in vivo* ».

Concernant les études de toxicité liées à la reproduction, le E171 ne semble pas présenter d'effets adverses alors que dans le cas du TiO₂ n'étant pas de qualité alimentaire, des résultats contradictoires ont été rapportés, notamment sur la variation des niveaux hormonaux. Cependant, des lacunes ont été relevées concernant la méthodologie mise en place pour ces études. En

² L'article 3 (2) du règlement n°1333/2008 précise que '*quantum satis*' signifie qu'aucun niveau maximal n'est spécifié. La substance peut être utilisée en accord avec les bonnes pratiques de fabrication en ne dépassant pas le niveau requis pour atteindre l'objectif technologique.

raison de l'absence de données robustes concernant la toxicité liée à la reproduction, le groupe d'experts de l'Efsa n'a pas été en mesure de conclure sur cet effet ni de fixer une valeur toxicologique de référence.

En ce qui concerne les effets immunotoxiques du TiO₂, le Panel de l'Efsa a considéré qu'en l'absence d'une caractérisation adéquate du matériel utilisé dans les différentes études disponibles et au vu des différences dans les effets rapportés selon diverses voies d'administration et la diversité des effets observés, il n'est pas possible de conclure sur les éventuels effets immunotoxiques de l'additif E 171.

Des études de cancérogenèse réalisées avant 1979 (NTP 1979) ont été menées sur du TiO₂ Unitane® (forme anatase) chez des souris B6C3F1 (50 individus/sexe) à des doses allant de 0 à 6 500 mg de TiO₂.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour les mâles et de 0 à 8 350 mg de TiO₂.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour les femelles pendant 103 semaines *via* l'alimentation. Des observations histopathologiques ont été menées sur une trentaine d'organes. Les résultats indiquent que le TiO₂ administré oralement à ces doses n'est pas cancérogène chez les souris B6C3F1. Des études identiques ont été menées chez des rats Fischer 344 (50 individus/sexe) à des doses allant de 0 à 2 250 mg de TiO₂.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour les mâles et de 0 à 2 900 mg de TiO₂.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour les femelles pendant 103 semaines *via* l'alimentation. Des observations histopathologiques ont également été menées sur une trentaine d'organes. Les résultats indiquent que le TiO₂ administré par voie orale (*via* les aliments) n'est pas cancérogène chez les rats Fischer 344 à ces doses. A partir de ces études de cancérogenèse menées chez le rat et la souris, le panel a fixé la dose sans effet nocif observable à 2 250 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

Concernant les données d'exposition, le panel de l'Efsa a pu élaborer différents scénarii d'exposition à partir des données fournies par les industriels et les Etats membres. Le scénario d'exposition maximaliste prend en considération les valeurs maximales d'utilisation (ou mesurées) rapportées par l'industrie pour l'ensemble des aliments (dont les données sont connues) susceptibles de contenir du E171. La valeur moyenne d'exposition calculée concernant les nourrissons et les personnes âgées est de 0,4 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (1,2 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ au 95^{ème} centile) et de 10,4 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (32,4 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ au 95^{ème} centile) pour les enfants. Ce scénario est considéré comme étant le plus protecteur puisqu'il considère une exposition *via* entière à des teneurs d'incorporation (ou mesurées) maximales de E171.

L'Efsa a également déterminé deux scénarii d'exposition affinés. Le premier scénario prend en compte la fidélité aux marques pour lequel il est supposé que la population est exposée sur le long terme à des teneurs maximales d'incorporation (ou mesurées) d'additifs alimentaires pour une catégorie d'aliment et à une teneur moyenne pour les autres catégories d'aliments. La valeur moyenne d'exposition calculée concernant les nourrissons et les personnes âgées est de 0,4 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (à 1,1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ au 95^{ème} centile) et de 8,8 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (30,2 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ au 95^{ème} centile) pour les enfants.

Le second scénario ne prend pas en compte la fidélité aux marques et il est supposé que la population est exposée sur le long terme à des teneurs moyennes d'incorporation (ou mesurées) d'additifs alimentaires pour l'ensemble des catégories d'aliments. La valeur moyenne concernant les nourrissons et les personnes âgées est de 0,2 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (0,5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ au 95^{ème} centile) et de 5,5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (14,8 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ au 95^{ème} centile) pour les enfants.

Le panel a considéré le scénario ne prenant pas en compte la fidélité aux marques comme étant le scénario le plus approprié et réaliste pour l'évaluation du risque car il est supposé que la population sera exposée au long terme à des additifs alimentaires présents à une valeur d'utilisation moyenne dans les aliments.

Ainsi, la marge de sécurité la plus basse calculée à partir de la dose sans effet nocif observable de 2 250 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ est de 150. Dans les lignes directrices relatives aux additifs alimentaires (EFSA, 2012), le panel d'experts considère pour les composés non génotoxiques et non

cancérogènes qu'une marge de sécurité d'une valeur de 100 ou plus est jugée comme non préoccupante.

Le groupe d'experts de l'Efsa émet les recommandations suivantes :

- Dans l'optique d'établir une valeur toxicologique de référence pour l'additif alimentaire E171, une étude sur une génération étendue ou multigénérationnelles, respectant les lignes directrices de l'OCDE, devrait être menée avec de l'additif alimentaire E171 conforme aux spécifications de l'UE et dont la distribution en taille serait préalablement caractérisée.
- Les spécifications de l'UE relatives au E171 devrait inclure la caractérisation de la distribution en taille des particules de TiO₂ (gamme, médiane, quartiles) en utilisant les outils statistiques adaptés ainsi que le pourcentage (en nombre et en masse) des nanoparticules utilisées en tant qu'additif alimentaire. Les méthodes de mesures devront être en accord avec le document guide de l'Efsa³.
- Les limites maximales concernant les impuretés d'éléments toxiques (arsenic, mercure, cadmium et plomb) mentionnées dans les spécifications de l'UE pour le TiO₂ devraient être révisées afin d'assurer que le E171 ne soit pas une source significative d'exposition à ces éléments.

Le groupe conclut qu'une fois les données relatives à la toxicité pour la reproduction disponibles, une valeur toxicologique de référence pourrait être déterminée.

3.3. Règlementation

Comme toutes substances chimiques, les nanomatériaux sont réglementés en fonction de leurs usages. Pour les usages hors réglementation sectorielle, la réglementation Reach s'applique. Quelle que soit la réglementation, aucune provision spécifique ne leur est appliquée à ce jour. Les règlements relatifs aux cosmétiques⁴, aux biocides⁵ et à l'alimentation (INCO⁶ et novel food⁷) stipulent l'obligation d'étiquetage des produits contenant des nanomatériaux avec la mention [nano]. Dans le domaine de l'alimentation, les règlements INCO et novel food proposent pour définir les nanomatériaux manufacturés la définition suivante: « *nanomatériaux manufacturés : tout matériau produit intentionnellement présentant une ou plusieurs dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins, ou composé de parties fonctionnelles distinctes, soit internes, soit à la surface, dont beaucoup ont une ou plusieurs dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins, y compris des structures, des agglomérats ou des agrégats qui peuvent avoir une taille supérieure à 100 nm mais qui conservent des propriétés typiques de la nanoéchelle* ».

En 2011, la Commission européenne a publié des recommandations⁸ relatives à la définition des nanomatériaux. Ainsi, ce document précise qu'un nanomatériau est : « *un matériau naturel, formé*

³ Efsa Scientific Committee, 2011. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. EFSA Journal 2011; 9(5): 2140, 36 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2140. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm

⁴ Règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques.

⁵ Règlement (UE) n°528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides.

⁶ Règlement (UE) n°1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, modifiant les règlements (CE) n°1924/2006 et (CE) n°1925/2006 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 87/250/CEE de la Commission, la directive 90/496/CEE du Conseil, la directive 1999/10/CE de la Commission, la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil, les directives 2002/67/CE et 2008/5/CE de la Commission et le règlement (CE) n°608/2004 de la Commission.

⁷ Règlement (UE) n°2015/2283 du Parlement européen et du Conseil du 25 novembre 2015 relatif aux nouveaux aliments, modifiant le règlement (UE) n°1169/2011 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant le règlement (CE) n°258/97 du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n°1852/2001 de la Commission.

⁸ Recommandation de la Commission européenne du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux.

accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégats ou sous forme d'agglomérats, dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ».

3.4. Les usages de l'additif alimentaire E171

L'additif alimentaire E171 est largement utilisé en tant que colorant dans différentes catégories alimentaires. En France, le E171 est notamment utilisé dans la production de confiseries, de desserts et crèmes glacés, de produits de boulangerie et pâtisserie, de biscuits, de gâteaux, de tablettes de chocolat, de desserts réfrigérés, etc. (source GNPD⁹). Le TiO₂ n'apparaît pas dans le secteur des utilisations « fabrication de produits alimentaires » dans l'outil de déclaration R-nano exploitée par l'Anses dans un cadre réglementaire pour le compte de ses ministères de tutelles.

3.5. Analyse de la publication de Bettini *et al.* (2017)¹⁰

3.5.1. Présentation de l'étude

Dans l'article de Bettini *et al.*, des groupes de rats ont été exposés pendant 7 jours (par gavage) ou 100 jours (par administration dans l'eau de boisson) à un lot de E171 (redispersé par ultrasonication en solution d'albumine de sérum bovin (BSA)) ou à des nanoparticules de TiO₂ de référence (NM-105, Joint Research Center JRC), uniquement utilisées pour l'exposition sur 7 jours, à des doses du même ordre de grandeur que celles observées pour l'exposition humaine. Les auteurs se sont intéressés au passage de la barrière intestinale, à la distribution dans quelques organes, à la variation de paramètres immunologiques ainsi qu'au potentiel génotoxique et cancérogène (initiation, promotion) du TiO₂.

3.5.2. Préparation des matériaux pour l'étude

Les deux matériaux (E171 et NM-105) ont fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique puis, avant utilisations expérimentales, ont été dispersés en solution de BSA (0,05% m/v) par ultrasonication en suivant un protocole dérivé de celui décrit dans les rapports du programme européen Nanogenotox¹¹.

3.5.3. Caractérisation physico-chimique du TiO₂

Des méthodes de caractérisation physico-chimiques ont été mises en œuvre spécifiquement pour le E171. Le NM-105, matériau de référence, avait été préalablement caractérisé. Les paramètres mesurés concernant le E171 sont les suivants : distribution en taille ; forme ; état d'agglomération/agrégation ; composition ; dispersibilité, chimie de surface et densité de charge de surface.

Concernant la structure cristalline des matériaux, le NM-105 possède une cristallinité mixte (85% anatase et 15% rutile). Concernant la nature cristalline du E171, selon les auteurs, les spectres XANES¹² du titane (Ti) du E171 et du NM-105 se chevauchant, cela indique une forme cristalline similaire, donc que le E171 est principalement composé de TiO₂ anatase. Les analyses TEM-

⁹ Global New Products Database.

¹⁰ L'expertise a porté sur la publication de Bettini *et al.*, (2017) et sur les éléments recueillis lors de l'audition des auteurs.

¹¹ Final protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media. The generic NANOGENOTOX dispersion protocol. 2011.

¹² X-ray Absorption Near Edge Structure: méthode d'analyse spectroscopique par absorption de rayons X.

EDX¹³ montrent que l'échantillon de E171 ne présente pas d'impuretés (absence d'alumine, de phosphate ou de silice) et est donc « quasi » pur.

Concernant les mesures de taille, le NM-105 présente, au microscope électronique à transmission (TEM), un diamètre particulaire moyen de 22 ± 1 nm (gamme comprise entre 10-45 nm). La distribution granulométrique primaire déterminée par TEM variait de 20 à 340 nm (moyenne et écart-type de 118 ± 53 nm) et 44,7% des particules avaient des tailles inférieures à 100 nm de diamètre.

Les images obtenues au TEM montrent que les particules issues du lot de E171 présentent une forme sphérique, et sont en partie isolées ou sous la forme de petits agglomérats lorsqu'elles sont dispersées dans l'eau avant l'administration orale par gavage ou *via* l'eau de boisson chez le rat.

Les auteurs ont également mesuré le diamètre hydrodynamique, l'index de polydispersité (PDI) et le potentiel zêta (ζ) des particules de TiO₂ après dispersion, à l'aide de techniques de type DLS (Dynamic Light Scattering). Le diamètre hydrodynamique moyen du E171 a été mesuré à 373 ± 20 nm (écart-type), ce qui est compatible avec les mesures rapportées pour d'autres E171 commerciaux (EFSA 2016, de 127 à 504 nm selon le fournisseur). Les potentiels ζ (moyenne \pm écart-type) étaient de $5,03 \pm 0,02$ mV et de $-23,9 \pm 2,4$ mV, respectivement pour le NM-105 et le E171. Cette différence suggère une plus grande stabilité de la suspension du E171 dans l'eau par rapport à celle du NM-105 du fait d'une plus grande répulsion électrostatique entre les particules. Compte-tenu de l'ensemble des caractéristiques mesurées, les auteurs concluent que le lot commercial sélectionné est représentatif du E171.

- **Conclusions et recommandations du GECU concernant la caractérisation physico-chimique**

Sur les huit paramètres définis dans la norme ISO TR13014:2012¹⁴, les auteurs ont renseigné : la distribution en taille ; la forme ; l'état d'agglomération/agrégation ; la composition ; la dispersibilité, la chimie de surface et la densité de charge de surface (seule l'aire de surface manque pour le E171). Les paramètres et les outils de caractérisation physico-chimique utilisés apparaissent pertinents et la caractérisation physico-chimique très complète.

Les caractéristiques physico-chimiques (forme cristalline, distribution en taille, fraction nanométrique) du E171 sélectionné par Bettini *et al.* (2017) sont celles majoritairement rapportées pour d'autres lots de E171 de qualité alimentaire et apparaissent donc comme représentatives.

Concernant la comparaison au NM-105 (matériau contenant 100% de particules de taille nanométrique), au-delà de la forme cristalline et de la distribution en taille, des paramètres clés comme la composition élémentaire (incluant les impuretés) peuvent se révéler déterminants dans le comportement (biocinétique) et dans la toxicité d'un nanomatériau. Dans le cadre de cette étude, des différences de composition et de charges de surfaces ont été relevées entre le E171 et le NM-105. Par conséquent, si l'objectif de cette publication était de chercher à déterminer la part attribuable à la fraction nanométrique d'éventuels effets spécifiques, alors, il aurait été préférable d'effectuer la comparaison avec la seule part nanométrique du E171. Cependant, la faisabilité d'une telle étude reste techniquement difficile à l'heure actuelle.

¹³ Transmission electron microscopy-Energy dispersive X ray: méthode d'analyse de la composition élémentaire.

¹⁴ ISO/TR 13014:2012 Nanotechnologies - Directives relatives à la caractérisation physico-chimique des nano-objets manufacturés soumis aux essais toxicologiques.

3.5.4. Voies d'exposition

Suite au protocole de dispersion du E171 et du NM-105, deux voies d'exposition orale ont été utilisées dans cette étude. Dans la première, des rats ont été exposés pendant 7 jours par gavage intra gastrique à la dose de E171 et de NM-105 de $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Dans la seconde, des rats ont été exposés pendant 100 jours *via* l'eau de boisson, renouvelée tous les 2 jours, à des doses de E171 de $200 \text{ } \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et de $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

- **Remarques du GECU relatives aux voies d'expositions et à la représentativité du E171 utilisé dans l'étude**

Suite à l'étape de dispersion du E171 en solution dans la BSA suivie d'une ultrasonication, le GECU s'interroge d'abord sur la représentativité de la forme (BSA+ultrasonication) et de la méthode d'exposition ainsi que de leur éventuel impact sur les effets observés au sein de l'étude. Par ailleurs, l'étape d'ultrasonication peut favoriser la redispersion des nanoparticules engagées dans la structure d'agrégats ou d'agglomérats augmentant ainsi la proportion de nanoparticules au sein de l'échantillon par rapport à du E171 ajouté directement à la matrice alimentaire.

Enfin, le fait que les voies d'exposition reposent uniquement sur une exposition en milieu aqueux amène également le GECU à s'interroger sur les différences de biodisponibilité entre le E171 en solution et le E171 intégré dans une matrice alimentaire solide.

Pour l'ensemble de ces raisons, la préparation utilisée de E171 dispersé en solution de BSA puis ultrasoniqué peut apparaître comme peu représentative de l'additif alimentaire E171 tel que présent dans les aliments mais pourrait permettre d'identifier certains dangers associés à des usages du E171.

3.5.5. Immunotoxicité

Trois études ont été menées afin d'évaluer la variation de certains paramètres immunitaires et inflammatoires.

Dans la première étude, 2 groupes de 10 rats Wistar mâles ont été exposés à $10 \text{ mg de E171.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et $10 \text{ mg de NM-105.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ par gavage intra-gastrique pendant 7 jours. Un groupe de rats non exposés a été utilisé comme groupe contrôle.

Au cours de cette étude, les auteurs ont observé au niveau des plaques de Peyer une augmentation significative du nombre de cellules dendritiques (CD) ainsi qu'une diminution significative du nombre de lymphocytes Tregs et Th après exposition au E171 et NM-105. Il faut noter que si l'augmentation du pourcentage de CD est retrouvée avec les nanoparticules NM-105, celle-ci n'a pas entraîné de modification des taux de lymphocytes. L'exposition au NM-105 n'a pas modifié le pourcentage de CD dans la rate. Dans la muqueuse intestinale (jéjunum et côlon) aucun signe d'une réaction inflammatoire (*via* les marqueurs suivants : myéloperoxydase, TNF- α , IL-10, IL-1 β , IFN- γ , IL-17) n'a été détecté après 7 jours d'exposition au E171 et au NM-105.

Dans la seconde étude, un groupe de rats a été exposé à $10 \text{ mg de E171.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pendant 100 jours *via* l'eau de boisson agitée tous les jours et renouvelée tous les 2 jours. Les rats du groupe contrôle ont été exposés à de l'eau uniquement.

Contrairement aux effets observés au niveau des plaques de Peyer après 7 jours d'exposition, le nombre de CD ne varie plus après 100 jours d'exposition au E171 à une dose de $10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, alors que le nombre de Tregs et de Th diminue. Au niveau du côlon, parmi toutes les cytokines mesurées (TNF- α , IL-10, IL-1 β , IFN- γ , IL-17, IL-8, IL-6, IL-18), des augmentations significatives ont été rapportées après 100 jours d'exposition pour le TNF- α (+ 26%), l'IL-10 (+ 26%) ainsi que pour l'IL-8 (+ 45%), ceci en l'absence de signes évidents d'une réaction inflammatoire locale (par exemple infiltration par des polynucléaires). Cette étude ne présente pas de résultats sur les

aspects inflammatoires et immunitaires pour les rats ayant reçu 200 µg de E171.kg pc⁻¹.j⁻¹ pendant 100 jours.

Dans la troisième étude, des cellules des plaques de Peyer et de la rate prélevées sur 4 rats issus d'un groupe non exposé au E171 ni au NM-105 ont été utilisées pour étudier l'effet *in vitro* de l'adjonction de E171 et de NM-105 (doses variant de 0 à 150 µg/mL dans le milieu de culture pendant 4 jours) sur la réponse proliférative à un mitogène spécifique (concanavoline-A) des lymphocytes T et sur la cytotoxicité. Dans les cellules isolées à partir des plaques de Peyer et de la rate et après stimulation (4 jours) *in vitro* par des anticorps anti CD3/CD28 induisant la sécrétion de cytokines, la production d'IFN-γ diminue dans les cellules des plaques de Peyer et augmente dans celles de la rate ; la production d'IL-17 est inchangée dans les cellules des plaques de Peyer et augmente dans celles de la rate. Des modifications comparables sont retrouvées avec les nanoparticules NM-105. Enfin, le traitement avec diverses concentrations (0, 37, 75 et 150 µg/mL) de NM-105 et de E171 n'a induit une diminution significative de la prolifération cellulaire et de la cytotoxicité que pour la plus forte concentration testée (150 µg/mL dans le milieu de culture). Aux autres concentrations, il n'est pas observé d'effets statistiquement significatifs.

- **Conclusions et recommandations du GECU relatives aux effets liés à l'immunité et l'inflammation**

D'un point de vue méthodologique, l'étude sur les effets liés à l'immunité et l'inflammation a été bien conduite. De nombreux paramètres pertinents pour l'étude d'une réponse inflammatoire et immunitaire ont été inclus.

La captation de (nano)particules de TiO₂ par les cellules des plaques de Peyer et les mécanismes aboutissant à une distribution dans l'organisme (y compris dans la rate) est un phénomène qui a déjà été rapporté dans la littérature et repris dans l'avis de l'Efsa (2016) pour ce type de structure.

Les résultats présentés indiquent qu'il existerait dans la rate, après 7 jours d'exposition, une population de cellules qui serait, après une stimulation spécifique, particulièrement apte à répondre pour produire de l'IFN-γ et, dans une moindre mesure, de l'IL-17. Afin de mieux pouvoir interpréter cette réponse de l'IFN-γ il serait intéressant de disposer des dosages d'IL-4, IL-6 and IL-10 obtenus dans les mêmes conditions ainsi que d'une étude histologique de la rate.

L'étude ne rapporte pas l'apparition d'une réaction inflammatoire caractéristique dans le côlon (changement histologique, infiltration cellulaire) et la notion de « low grade inflammation » est difficilement étayée par les résultats présentés.

Dans l'ensemble, les pourcentages de variations rapportés dans cette étude, lorsqu'ils sont statistiquement significatifs, restent relativement faibles et leur signification biologique reste à confirmer. Par ailleurs, les interprétations données par les auteurs sont des hypothèses de travail possibles mais celles-ci ne sont pas totalement étayées par les résultats. Ainsi, bien qu'ils présentent des modifications pour certains paramètres immunitaires, ils ne sont pas suffisants pour affirmer une déficience (« impairment ») de l'homéostasie immunitaire. Ces résultats sont comparables à ceux déjà rapportés dans la littérature pour les nanoparticules de TiO₂ et qui montrent des réactions dépendantes de la taille des particules utilisées, des conditions de l'administration et de la dose administrée (Shakweh *et al.* 2004 ; Kang *et al.* 2008 ; Liu *et al.* 2010 ; Lappas 2015 ; Smith *et al.* 2014). L'étude rapporte des signes limités (variation du pourcentage de CD, de lymphocytes Tregs et Th) d'une réaction immunitaire locale et systémique.

En conclusion, en ce qui concerne les aspects inflammatoires et immuno-modulateurs, les évaluations actuellement disponibles pour le E171 utilisé en tant qu'additif alimentaire ne sont pas remises en question par les données de cette étude.

3.5.6. Test des comètes

Un test des comètes a été réalisé sur des cellules des plaques de Peyer après 7 jours d'exposition au E171 ou au NM-105 à une dose de 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Les cellules ont été collectées dans une solution de NaCl-EDTA (0,075 M et 0,024 M), incorporées dans un gel d'agarose, déposées sur lame puis lysées avant la séparation électrophorétique. En parallèle, des tests ont été menés en utilisant de la formamido pyrimidine glycosylase (Fpg) afin d'augmenter la sensibilité du test aux dommages oxydatifs.

Les auteurs de l'étude n'observent pas d'effet génotoxique sur les cellules isolées des plaques de Peyer de rats exposés pendant 7 jours au E171 ou au NM-105 dans le test standard et modifié.

- **Conclusions et recommandations du GECU relatives au test des comètes**

La méthodologie utilisée pour mener le test des comètes n'est pas précisée au sein de l'étude. Il n'est donc pas possible d'évaluer la pertinence du protocole réalisé (conditions de migration, concentration en Fpg, témoins avec tampon enzyme, nombre de comètes étudiées, quantification des « hedgehogs », etc.). Même si la ligne directrice OCDE 489 recommande d'effectuer les mesures 2 à 6 heures après la dernière administration, compte tenu de la persistance possible dans l'organisme des particules pas ou peu solubles, un temps de 24h après la dernière exposition peut être acceptable. La ligne directrice OCDE 489 recommande de réaliser le test avec au moins 3 doses afin de pouvoir mettre en évidence une relation dose-réponse. L'étude de Bettini *et al.* ne comporte qu'une seule dose pour chaque composé testé. Enfin, une représentation graphique permettrait de mieux apprécier la distribution des valeurs et la variabilité de réponse entre les animaux d'un même groupe.

Aucun témoin positif (par exemple le méthyl méthanesulfonate : MMS) n'a été utilisé lors de cette étude contrairement à ce qui est préconisé dans la ligne directrice 489 de l'OCDE. De plus, le test des comètes a été réalisé sur les cellules des plaques de Peyer : il s'agit d'un tissu particulier pour lequel aucune publication avec ce test n'est disponible dans la littérature. Dans ce contexte, il est difficile de conclure quant à la validité de l'essai sur ce type de prélèvements.

De même, les résultats avec la Fpg sont discutables. En effet, compte tenu du « stress oxydant » généré par le métabolisme basal des cellules, de nombreuses bases oxydées sont présentes dans les cellules du groupe des témoins. Ceci se traduit par une augmentation des cassures dans le test des comètes. Cependant, dans la publication, aucune augmentation n'est observée après traitement avec l'enzyme Fpg dans les témoins. L'absence de témoins positifs du stress oxydant ne permet pas de vérifier s'il s'agit ou non d'un problème d'expérimentation (activité et concentration de la Fpg par exemple).

3.5.7. Marqueurs de cancérogenèse

Les études d'un potentiel cancérogène ont porté sur l'apparition et l'évolution de foyers de cryptes aberrantes (FCA) sur des rats, induits ou non par un initiateur exposés *via* l'eau de boisson à du E171 (préalablement redispersé en BSA et ultrasoniqué) pendant 100 jours. Ces FCA sont considérés par les auteurs comme étant les lésions histopathologiques les plus précoces en lien avec la formation du cancer colorectal. Ces FCA sont l'unique biomarqueur utilisé dans cette étude pour décrire les lésions prénéoplasiques. Les auteurs de l'étude ont précisé que les FCA dont le nombre de cryptes est supérieur ou égal à 4 étaient considérés comme de « grands FCA ». Une première étude a porté sur l'impact du E171 en tant que promoteur de FCA chez le rat. La seconde étude a porté sur la capacité du E171 à initier l'apparition de FCA chez le rat.

3.5.7.1 Remarques du GECU relatives à l'utilisation des foyers de cryptes aberrantes en tant que biomarqueur de lésions prénéoplasiques

De nombreuses preuves indirectes étayent l'hypothèse selon laquelle les FCA (foyer de cryptes aberrantes) sont des lésions précancéreuses. Plus précisément, c'est la corrélation entre l'incidence tumorale et le nombre de « grands FCA » qui peut représenter une preuve majeure. Cependant, il ne semble pas exister de définition admise par tous d'un « grand FCA ». Les auteurs ont choisi de mettre un seuil de définition d'un « grand FCA » à plus de 3 cryptes aberrantes / côlon. Pourtant, d'autres auteurs ont fixé ce seuil à 10 cryptes aberrantes (Maurin *et al.* 2006). Par ailleurs, une corrélation significative n'établit pas toujours un lien de causalité.

Le caractère prédictif d'une incidence tumorale apporté par les « grands FCA » ne fait pas consensus et leur présence ne signifie pas que ces lésions évolueront nécessairement vers le cancer (Wargovich *et al.* 2010).

De plus, d'autres microlésions ont été décrites et peuvent être liées à de réelles lésions précancéreuses du côlon (Beta-Catenin-Accumulated Crypts (BCAC) ; Mucin Depleted Foci (MDF) ; FCA dysplasique et FCA-min qui sont des FCA atypiques vus chez les souris Min (Apc min/+) n'ayant qu'un seul allèle fonctionnel du gène Apc). Maurin *et al.* (2006) corrélaient la progression des tumeurs provenant de « grands FCA » vers la cancérogenèse du côlon chez le rat avec l'expression du gène MUC5AC.

En conclusion, la présence de « grands FCA » (et *a fortiori* de FCA) doit être perçue comme étant présumée marqueur de lésions précancéreuses mais la seule incidence significativement augmentée de « grands FCA » ne signifie pas obligatoirement une évolution vers un processus tumoral.

3.5.7.2 Effet promoteur

Afin d'étudier l'impact du E171 sur la promotion de FCA, des rats Wistar mâles adultes ont été prétraités avec une injection intrapéritonéale de 1,2-diméthylhydrazine (DMH) à une dose de 180 mg.kg pc⁻¹ afin d'initier le processus de cancérogenèse au niveau du côlon. Sept jours après le traitement, les rats ont été répartis de manière aléatoire en 3 groupes de 12 rats puis ont été exposés à des doses de 0 (contrôle, eau seulement), 200 µg de E171.kg pc⁻¹.j⁻¹ ou 10 mg de E171.kg pc⁻¹.j⁻¹ dans de l'eau de boisson pendant 100 jours. A la fin de la période d'exposition, les animaux sont sacrifiés, les côlons sont prélevés, codés et examinés pour la recherche cytologique des anomalies de la muqueuse colique par une coloration classique au bleu de méthylène.

Les auteurs n'ont pas observé d'augmentation significative du nombre total de FCA par côlon aux deux doses testées par rapport au contrôle. Cependant, des augmentations statistiquement significatives du nombre de cryptes aberrantes par côlon et du nombre de « grands FCA » par côlon ont été observées exclusivement dans le groupe de rats exposé à 10 mg de E171.kg pc⁻¹.j⁻¹.

- **Remarques du GECU relatives aux études de promotion**

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats montre que, chez des rats initiés par la DMH, l'exposition *via* l'eau de boisson à du E171 (préalablement redispersé en BSA et ultrasoniqué) à la concentration de 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ pendant 100 jours augmente de façon statistiquement significative le nombre de cryptes aberrantes par côlon et le nombre de « grands FCA » par côlon. Ce résultat témoigne d'un effet promoteur potentiel du E171 chez des animaux initiés par la DMH. D'autres études (Mori *et al.* 2005 et Paulsen *et al.* 2001) ont rapporté que certains biomarqueurs (Mucin Depleted Foci, Beta catenin accumulated crypt) pouvaient apparaître comme plus pertinents dans la prédiction du développement de tumeurs colorectales chez les rongeurs.

3.5.7.3 Etudes *in vitro* et mécanismes relatifs aux effets de promotion

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans les potentiels effets promoteurs observés, des études *in vitro* relatives à la cytotoxicité du E171 sur des cellules épithéliales coliques de rat normales (gène *Apc* non muté (*Apc* +/+)) ou préneoplasiques (gène *Apc* muté (*Apc* min/+)) ont été menées. Après 24h d'exposition de ces cellules à des doses de 2,56 et 25,6 µg/mL de E171, la cytotoxicité est plus élevée sur la lignée de cellules épithéliales *Apc* +/+ que sur la lignée *Apc* min/+. La même étude a été menée avec le NM-105 aux mêmes doses. D'après les auteurs, l'exposition au NM-105 induit une cytotoxicité préférentielle vis-à-vis des cellules préneoplasiques. Ainsi, l'hypothèse mécanistique d'une sélection de cellules préneoplasiques aux premiers stades du processus de transformation est apportée par les auteurs. Le GECU précise que cette hypothèse n'est pas la seule plausible pour expliquer les effets de promotion enregistrés : par exemple, un déficit des réactions de méthylation par le TiO₂ décrit *in vitro* (Tucci *et al.* 2013) ainsi que l'induction de miARNs *in vivo* (Halappanavar *et al.* 2011.) laissent suspecter des mécanismes épigénétiques.

- **Remarques du GECU relatives aux études *in vitro* et corrélations entre les études *in vitro* et *in vivo***

Les différences de niveaux de cytotoxicité vis-à-vis de cellules *Apc* +/+ et *Apc* Min/+ après 24 h d'exposition au E171 ou au NM-105 sont très faibles :

- Pour le E171 : 12 vs 5% pour les cellules *Apc* +/+ et 5 vs 2% pour les cellules *Apc* Min/+, respectivement à 2,56 et 25,6 µg/mL.
- Pour le NM-105 : 10 vs 2% pour les cellules *Apc* +/+ et 4 vs ≈1 % pour les cellules *Apc* Min/+, respectivement à 2,56 et 25,6 µg/mL.

La variabilité expérimentale de l'estimation indirecte de la cytotoxicité par la technique au MTT¹⁵ n'étant pas connue dans les conditions expérimentales de l'étude, il est impossible de garantir une quelconque significativité biologique. Il apparaît par conséquent difficile de relier les faibles différences observées à une preuve de la sélection de cellules préneoplasiques. De plus, les phénomènes susceptibles de mener à une cytotoxicité apparente sont très divers et il n'est pas possible d'affirmer que, puisqu'un même différentiel de cytotoxicité existe, la fraction nanométrique des particules de TiO₂ présente dans le E171 en est à l'origine.

Enfin, la reproductibilité des résultats obtenus *in vitro* doit toujours être vérifiée ce qui ne semble pas être le cas ici.

3.5.7.4 Effet initiateur

Afin d'étudier la capacité du E171 à initier l'apparition spontanée de FCA, des rats Wistar mâles adultes sont exposés à des doses de 0 (contrôle, eau seulement) ou 10 mg de E171.kg pc⁻¹.j⁻¹ dans de l'eau de boisson pendant 100 jours. A la fin de la période d'exposition, les animaux sont sacrifiés, les côlons sont prélevés, codés et examinés pour la recherche cytologique des anomalies de la muqueuse colique par une coloration classique au bleu de méthylène.

Parmi les animaux exposés au E171 à la dose de 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, quatre rats sur onze présentaient des foyers de cryptes aberrantes dans le côlon, alors qu'aucun des 12 rats du groupe contrôle n'en comportait, la différence entre les deux groupes étant statistiquement significative. Pour trois des quatre rats, le nombre de cryptes aberrantes par foyer était faible (1 à 3). Pour le

¹⁵ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide tetrazolium

quatrième rat, un foyer de plus de 12 cryptes aberrantes a été observé, ce qui dénote une lésion plus sévère.

Les auteurs mentionnent également une augmentation modérée mais significative de TNF- α , IL-8 et IL-10 dans la muqueuse du côlon dans le groupe exposé au E171. TNF- α et IL-8 sont rapportées comme pouvant jouer un rôle dans les mécanismes de la cancérogenèse colorectale. Cependant, il n'est pas précisé si ces augmentations sont observées spécifiquement chez les rats présentant des augmentations du nombre de cryptes aberrantes.

3.5.7.5 Conclusions et recommandations du GECU concernant les études des marqueurs de cancérogenèse

Les membres du GECU considèrent que la méthodologie employée par les auteurs a suivi un modèle scientifiquement bien établi.

Un effet promoteur potentiel du E171 est observé au niveau du côlon. Si l'augmentation d'apparition des « grands FCA » semble modérée, il est à noter que les FCA sont présumés prédictifs des lésions prénéoplasiques. Ce potentiel promoteur a par ailleurs été rapporté chez la souris après initiation (par azoxyméthane induisant une colite), dans des conditions proches de la présente étude avec une induction tumorale au niveau du côlon (Urrutia-Ortega *et al.*, 2016). Dans l'étude de Bettini *et al.* (2017), la durée de suivi des animaux post exposition est insuffisante pour évaluer l'intensité des effets promoteurs du E171 sur l'incidence tumorale. Sur la base des tests réalisés *in vitro*, cet effet promoteur éventuel ne peut pas être attribué à la fraction nanométrique du E171.

En ce qui concerne le potentiel initiateur du E171, le nombre d'animaux testés est trop faible pour juger de sa significativité. De plus, l'étude d'Urrutia-Ortega *et al.*, (2016) réalisée sur des souris n'a pas rapporté d'effet initiateur du E171.

3.6. Conclusions et recommandations

Les membres du GECU reconnaissent la valeur scientifique de cette publication et les résultats qui en sont issus malgré les limites discutées avec les auteurs lors de leur audition et rapportées ci-dessus. Cette étude apporte de nouveaux éléments par rapport à l'avis de l'Efsa (2016) quant à un potentiel effet promoteur cancérogène du E171. Les membres du GECU émettent les conclusions et recommandations suivantes.

Concernant les effets liés à l'inflammation observés dans les études *in vivo*, ceux-ci sont modérés et leur significativité biologique n'est pas établie. Par ailleurs, l'apparition d'une réaction inflammatoire caractéristique dans le côlon (changement histologique, infiltration cellulaire) est difficilement étayée par les résultats présentés.

Concernant l'effet génotoxique au niveau des cellules des plaques de Peyer, l'absence de témoins positifs dans cette étude ainsi que de données historiques avec le test des comètes sur ce tissu ne permettent pas de conclure sur la génotoxicité du E171.

Enfin, en termes d'évaluation du risque du E171, les résultats présentés ne permettent pas de remettre en cause l'évaluation du E171 menée par l'Efsa et ne peuvent être utilisés sans avoir auparavant été confirmés et complétés en administrant du E171 aux animaux tel qu'il est présent dans la matrice alimentaire. L'effet promoteur potentiel du E171 observé au niveau du côlon nécessite d'être confirmé par des expérimentations intégrant l'utilisation de biomarqueurs supplémentaires et/ou portant sur des durées d'expositions plus longues afin d'évaluer l'induction tumorale. Un groupe supplémentaire composé d'un plus grand nombre d'animaux est nécessaire afin de confirmer ou infirmer un possible effet initiateur du E171.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du GECU et convient avec ses experts que les résultats de l'étude de Bettini *et al.* (2017) mettent en évidence des effets qui n'avaient pas été identifiés auparavant, notamment les potentiels effets promoteurs de la cancérogenèse du E171.

Si les résultats présentés dans cette publication ne permettent cependant pas à ce stade de remettre en cause l'évaluation du E171 menée par l'Efsa, l'Anses souligne la nécessité de conduire, selon des modalités et un calendrier à définir, les études nécessaires à la parfaite caractérisation du danger associé au E171.

Les études recommandées dans le présent avis, ainsi que celles mentionnées précédemment par l'Efsa, devront être réalisées avec un nombre suffisant d'animaux par groupe de doses et dans un environnement permettant d'assurer la bonne conduite de l'expérimentation selon les bonnes pratiques de laboratoire. L'acquisition, à terme, de données complémentaires propres à statuer sur les signaux observés est essentielle dans un contexte d'usage large et *quantum satis* d'un additif alimentaire dépourvu de DJA.

Par ailleurs, l'Anses rappelle l'existence d'autres études, financées par l'appel à projets du programme national de recherche Environnement-Santé-Travail opéré par l'Agence, en cours de publication et décrivant d'autres effets potentiels du TiO₂. Ces études portent notamment sur le passage de la barrière hémato-encéphalique du TiO₂. L'ensemble de ces résultats devra faire l'objet d'un examen par l'Efsa dans le cadre de son travail d'évaluation des additifs alimentaires.

L'Agence rappelle également que des actions d'évaluation parallèles sont en cours sur le dioxyde de titane dans le domaine non alimentaire. En effet dès 2006, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) avait classé le dioxyde de titane dans le groupe des substances « cancérogènes possibles chez l'Homme (2B) » par voie pulmonaire. L'apparition de tumeurs pulmonaires chez le rat après inhalation ou instillation de TiO₂ a amené l'Anses, le 20 mai 2015, à soumettre à l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) une proposition de classement du dioxyde de titane en tant que substance cancérogène de catégorie 1B (substance dont le potentiel cancérogène pour l'être humain est supposé) par voie pulmonaire, dans le cadre du règlement européen 1272/2008 dit « CLP »¹⁶. Cette proposition tend à couvrir le TiO₂ sous toutes ses phases cristallines et combinaisons de phases, tailles inférieures à 10 µm et morphologies de particules. Cet aspect revêt une importance particulière pour les expositions professionnelles. Une décision de l'ECHA est attendue pour le second semestre 2017.

Par ailleurs, concernant les matériaux nanostructurés, l'Anses souligne l'existence de nombreux travaux menés depuis 2006 au sein de l'Agence, tant sur l'alimentation humaine et animale que sur les produits de consommation ou l'exposition des travailleurs. Parmi les conclusions essentielles, l'Anses rappelle la nécessité de développer des protocoles d'étude de toxicologie pertinents pour évaluer les risques sanitaires des produits contenant des nanomatériaux (bonne caractérisation physico-chimique, protocole détaillé et reproductible, participation des sciences humaines et sociales etc.). L'Anses rappelle également sa recommandation de limiter l'exposition des salariés, des consommateurs et de l'environnement dans le cadre d'une approche graduelle, notamment en favorisant les produits sûrs, dépourvus de nanomatériaux, et équivalents en termes de fonction, d'efficacité et de coût. Dès lors que des dangers sont identifiés pour la santé humaine ou pour l'environnement, l'Agence recommande de peser l'utilité, pour le consommateur ou la collectivité, de la mise sur le marché de tels produits contenant des nanomatériaux, pour lesquels les bénéfices devraient être clairement démontrés.

Enfin, l'Agence rappelle les enjeux de renforcement de la traçabilité des produits de consommation contenant des nanomatériaux, essentiels aux travaux d'évaluation des risques. Elle souligne dans ce contexte les enjeux associés à l'amélioration du processus de déclaration mis en œuvre dans le

¹⁶ Classification, Labelling and Packaging - Classification, étiquetage et emballage des substances et des mélanges.

cadre du portail national R-nano afin d'assurer une meilleure description des nanomatériaux mis sur le marché, de leurs usages précis et des expositions de la population qui leurs sont associées.

Dr Roger GENET

MOTS-CLES

E171, Dioxyde de titane, Additif alimentaire

KEYWORDS

E171, Titanium dioxide, Food additive

ANNEXE

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

Membres du GECU « TiO₂ »

M. Jacques BELEGAUD–Professeur honoraire– compétences en toxicologie

Mme Valérie FESSARD–Chef d'Unité–Anses

M. Claude LAMBRE–Retraité–compétences en toxicologie

M. Fabrice NESSLANY–Directeur de laboratoire- compétences en toxicologie

Mme Paule VASSEUR– Professeur émérite- compétences en toxicologie

Coordination scientifique

M. Gilles RIVIERE – Adjoint au chef de l'unité d'évaluation des risques liés aux aliments – Anses

M. Bruno TESTE – Chargé de projet scientifique – Anses

BIBLIOGRAPHIE

Bettini S., Boutet-Robinet E., Cartier C., Coméra C., Gaultier E., Dupuy J., Naud N., Taché S., Gysan P., Reguer S., Thieriet N., Réfrégiers M., Thiaudière D., Cravedi J.-P., Carrière M., Audinot J.-N., Pierre F.H., Guzylack-Piriou L., Houdeau E. (2017). Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci Rep.* 2017, 7:40373.

Chen Z., Wang Y., Ba T., Li Y., Pu J., Chen T., Song Y., Gu Y., Qian Q., Yang J., Jia G. (2014) Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol. Letter.* 3, 314-319.

Donaldson, K. (2010) Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology.* 4:4,14-20.

EFSA (2012). Guidance for submission for food additive evaluations. *EFSA Journal* 2012;10(7):2760.

EFSA (2016). Re-evaluation of titanium dioxide (E171) as a food additive. *EFSA Journal* 2016;14(9):4545.

Halappanavar S., Jackson P., Williams A., Jensen K.A., Hougaard K.S., Vogel U., Yauk C.L., Wallin H. (2011). Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes

- induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: a toxicogenomic study. *Environmental and molecular mutagenesis*. 52:425-439.
- IARC Monographs (2010) on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc.
- Kang J.L., Moon C., Lee H.S., Lee H.W., Park E.M., Kim H.S., Castranova V. (2008). Comparison of the biological activity between ultrafine and fine titanium dioxide particles in RAW 264.7 cells associated with oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71, 478–485.
- Kuempel E.D., Ruder A. (2009). Titanium dioxide (TiO₂), citation for most recent IARC review. En ligne : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/TR42-4.pdf>.
- Lappas C.M. (2015). The immunomodulatory effects of titanium dioxide and silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology*, 85, 78–83.
- Liu R., Zhang X., Pu Y., Yin L., Li Y. (2010). Small-sized TiO₂ nanoparticles mediate immune toxicity in rat pulmonary alveolar macrophages in vivo. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 10, 5161–5169.
- Maurin N., Forgue-Lafitte M-E, Levy P., Zimmer A., Bara J. (2006) Progression of tumors arising from large ACF is associated with the MUC5AC expression during rat colon MNNG carcinogenesis. *Int. J. Cancer*. 120, 477–483.
- Mori H., Hata K., Yamada Y., Kuno T., Hara A. (2005). Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis *Chemico-Biological Interactions* 155 (2005) 1–9.
- NTP (National Toxicology Program) 1979 Bioassay of TiO₂ for possible carcinogenicity. Tech. Rep. Ser. 97,1979.
- Paulsen J. E., Steffensen I.-L., Løberg E. M., Husøy T., Namork E., Alexander J. (2001). Qualitative and Quantitative Relationship between Dysplastic Aberrant Crypt Foci and Tumorigenesis in the Min/1 Mouse Colon Cancer Research. 61, 5010–5015, 2001.
- Shakweh M., Ponchel G., and Fattal E. 2004. Particle uptake by Peyer's patches : a pathway for drug and vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 1 (1) : 141-163.
- Smith M.J., Brown J.M., Zamboni W.C. and Walker N.J. (2014). From Immunotoxicity to nanotherapy: the effects of nanomaterials on the immune system. *Toxicological Sciences*, 138, 249–255.
- Tucci P., Porta G., Agostini M., Dinsdale D., Iavicoli I., Cain K., Finazzi-Agró A., Melino G., Willis A. (2013). Metabolic effects of TiO₂ nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes. *Cell death & disease*, 2013 21;4:e549.
- Wargovich M.J., Brown V.R., Morris J. Aberrant crypt foci: the case for inclusion as a biomarker for colon cancer. *Cancers (Basel)*. 2010, 2(3):1705-16.
- Yang Y., Doudrick K., Bi X., Hristovski K., Herckes P., Westerhoff P., Kaegi R. (2014) Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles. *Environ. Sci. Technol.* 3;48(11):6391-40.